

棉花 *GhSEDEG38* 基因调控棉花耐盐性的功能分析

张伯阳 简逸楠 李 梦 杨细燕 张献龙

华中农业大学植物科学技术学院/作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 基于棉花体细胞胚胎再生不同时期表达谱中筛选出一系列差异表达转录因子, 通过 RT-PCR 和 qRT-PCR 分析这些转录因子在不同逆境处理下的表达, 发现 *GhSEDEG38* 基因(somatic embryogenesis differentially expressed gene 38)的表达受盐胁迫诱导明显上调; 序列分析发现 *GhSEDEG38* 编码 bZIP 型转录因子, 与拟南芥 *bZIP53* 基因同源。为进一步验证该基因的功能, 构建了该基因的 RNAi 干扰载体并转化棉花, 通过分子检测获得了表达量显著降低的转基因棉花株系。通过对萌发期和三叶期转基因材料 and 对照材料进行盐处理发现, 干涉 *GhSEDEG38* 基因降低棉花在萌发期及苗期对盐胁迫的抗性, 盐处理后转基因植株的 MDA 含量和活性氧含量显著高于对照材料, 而可溶性糖含量显著低于对照材料。综上, *GhSEDEG38* 参与棉花对盐胁迫的应答。

关键词 棉花; bZIP 转录因子; *GhSEDEG38* 基因; RNAi; 盐胁迫响应

中图分类号 S 562.503.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)05-0001-10

土地盐渍化严重制约了农林业生产, 是现代生态环境建设面临的严峻问题。全球约有 10 亿 hm^2 的土地受到盐渍化影响, 占陆地总面积的 7%, 次生盐渍化土地面积近 8 000 万 hm^2 , 其中 58% 发生在灌溉农区。在我国, 盐渍化土地总面积约为 3 600 万 hm^2 , 占全国可利用土地面积的 4.88%, 这一比例还在不断增加^[1]。世界范围内有超过 100 个国家面临土地盐渍化问题, 因此, 合理开发利用盐渍化土地已成为当务之急。

盐胁迫对植物生长发育的影响体现在许多方面。对植物形态发育整体表现为抑制组织器官的生长, 加速发育过程, 缩短营养生长期和花期^[2-4]; 在生理水平上, 引起渗透势变化, 改变膜系统通透性^[5-6]; 在分子水平上, 盐胁迫会导致植物体内酶活性变化, 包括光合作用及呼吸作用相关的酶类, 使植物代谢紊乱, 并加速有害次生代谢产物积累, 对植物造成毒害^[7-9]。棉花对盐胁迫耐受性略强于粮食作物^[10], 适当的盐胁迫可以促进棉花的生长和发育^[11], 但较强的盐胁迫依然会对棉花造成不利影响。有报道指出, 盐胁迫会影响棉花的诸多农艺性状, 与对照相比, 表现为株高显著降低, 单株果枝数、单株成铃数

下降, 籽棉产量下降, 纤维长度、比强度下降, 对盐敏感品种的影响更甚^[12]。

自 20 世纪 70 年代 Price 等首次报道棉花体细胞胚胎发生的重大成果以来, 突变体筛选和转基因已成为棉花育种及遗传改良的重要途径之一。植物体细胞胚的发育过程受到光照、温度、无机盐、糖类、激素等因素的影响, 逆境因子在其发生及发育过程中都起着重要的作用, 很多研究者都将逆境因子的调控作为优化体细胞胚发生体系的重要手段^[13-14]。在宁夏枸杞外植体分化过程中加入 AgNO_3 、 Ca^{2+} 可促进体细胞胚的发育并抑制畸形胚的形成^[15]; 在培养基中加入渗透胁迫因子如蔗糖、NaCl 等, 可以促进五加、海枣、胡萝卜等植物体细胞胚胎发育^[16]。棉花体细胞胚胎发育同样受多种无机盐及激素调节, 适当添加胁迫因子可促进体细胞胚的发育。在培养基中加入 NaCl 和 ABA 会加速体细胞胚的发育, 在这一过程中检测到诸多胁迫应答基因的表达水平变化^[17]。在棉花体胚发生差异表达的蛋白谱中发现 14.2% 的差异表达蛋白参与刺激响应^[18]。

bZIP(basic-region leucine zipper)是一类广泛存在于真核生物中的转录因子, 具有一个亮氨酸拉

收稿日期: 2018-09-25

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0101006)

张伯阳, 硕士研究生, 研究方向: 棉花抗非生物逆境分子生物学. E-mail: boyang19910926@sina.com

通信作者: 杨细燕, 博士, 教授, 研究方向: 棉花抗非生物逆境分子生物学. E-mail: yxy@mail.hzau.edu.cn

链结构域,和一个与 DNA 结合的碱性结构域,亮氨酸拉链结构域通过亮氨酸或异亮氨酸的重复结构域结合成同源或异源二聚体,其活性受二聚化作用和翻译后修饰调节^[19]。植物 bZIP 转录因子通过调节下游基因的表达水平参与植物响应激素及逆境胁迫的过程。对拟南芥 bZIP 转录因子的分析表明,其家族成员具有高度的结构保守性和一定程度的进化上的复杂性和多样性,其中 TGA 和 GBF 两个家族被证实与逆境胁迫应答密切相关^[20-21]。本研究基于体细胞胚胎发生表达谱中一个 bZIP 家族转录因子基因 *GhSEDEG38* 在盐处理下的差异表达,通过 RNAi 技术得到表达量降低的转基因材料,分析其调控棉花对盐胁迫应答的功能,以期棉花抗盐胁迫育种提供新材料。

1 材料与方法

1.1 材料

转基因受体材料陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) YZ1 由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室棉花组留存,材料的种植和处理均在棉花温室附楼棉花培养室进行。大肠杆菌菌株 TOP10 和农杆菌菌株 EHA105 由笔者所在实验室保存,pHellsgate4 载体由比利时 Gent 大学 Familienaam Voornaam 教授赠送;限制性内切酶购自 NEB 公司,BP 重组酶购自 Invitrogen,DNA 提取、质粒提取及 PCR 纯化试剂盒购自天根生物有限公司,qRT-PCR 试剂购自 ABI 公司,反转录酶 SuperScriptIII 购自 Invitrogen 公司,TA 克隆载体 pGEM-T 购自 Promega 公司。

1.2 体胚发生相关盐响应候选转录因子筛选

前期研究中从体胚发生的表达谱中筛选出一系列差异表达的转录因子^[22]。本研究选取 40 个高量表达的转录因子,分别命名为 *GhSEDEG1*-*GhSEDEG40*,通过设计引物,对 *GhSEDEG1*-*GhSEDEG40* 基因利用 RT-PCR 和 qRT-PCR 进行逆境表达模式分析,设置不同逆境条件处理(100 $\mu\text{mol/L}$ NaCl、12.5% PEG6000、100 $\mu\text{mol/L}$ ABA),以正常生长条件为对照,筛选盐胁迫下差异表达的基因,RT-PCR 和 qRT-PCR 的操作参照文献^[17]。

1.3 *GhSEDEG38* 基因的序列分析

GhSEDEG38 蛋白的相关特性通过 peptide-property-calculator (<http://pepcalc.com>) 进行分析。*GhSEDEG38* 蛋白的结构域用 ScanProsite 分析

(<http://expasy.org/tools/scanprosite/>)。从 NCBI 数据库中分别选取拟南芥、杨树和水稻中与 *GhSEDEG38* 同源的基因 (*AT3G62420*, *AT4G34590*, *AT1G75390*, *AT2G18160*, *Potri.002g196200*, *Potri.014g120800*, *Potri.005g231300*, *Potri.004g158200*, *Os12G37410*, *Os05G03860*, *Os02G03960*, *Os09G13570*) 的氨基酸序列及陆地棉中同源基因 (*GhD07G1271*, *GhA11G3073*, *GhD11G1147*) 的氨基酸序列,利用 ClustalX 软件进行同源比对,并构建进化树。亚细胞定位通过 Plant-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) 进行预测。基因的启动子序列分析通过 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行预测。

1.4 *GhSEDEG38* 基因 RNAi 载体构建、棉花遗传转化及植株再生

通过 BP 重组反应构建 *GhSEDEG38* 基因 RNAi 抑制表达载体^[23]。设计 *GhSEDEG38* 基因含有 attB1 和 attB2 接头的引物 (*GhSEDEG38*Ri-F: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGG-CCAGCGAGTTCTTCTGATTC; *GhSEDEG38*Ri-R: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAC-ATTCCATCTCAGCGTAGCG),以 YZ1 根系 cDNA 为模板,PCR 扩增获得 attB-PCR 产物,将扩增产物与 pHellsgate4 进行 BP 反应,BP 反应产物转化大肠杆菌感受态细胞,培养后挑选单克隆用引物 (35S-F: CTGACGTAAGGGATGACGC; *GhSEDEG38*-R: ATCTTTCTGCAATGCGCTCAC) 检测阳性,对阳性单克隆提取质粒用 *Xho*I 和 *Xba*I 两种限制性核酸内切酶分别进行酶切检测,确认片段是否连接正确,将酶切检测正确的质粒转化 EHA105 保存备用。

棉花的遗传转化及植株再生过程具体参照文献^[24]进行。将含有 RNAi-*GhSEDEG38* 载体质粒的农杆菌转入棉花无菌苗的下胚轴,进行筛选培养,每 4 周继代 1 次,直到出现再生苗,将再生苗继代到生根培养基中促进根系生长,健壮的再生苗种植于温室土钵中。

1.5 转基因材料的分子鉴定

1) 棉花的转基因植株阳性鉴定。取 0.1 g 的植株新鲜叶片,参照改良的 CTAB 法提取棉花的总 DNA^[24],将得到的 DNA 溶液稀释到 100~200 ng/ μL 作为 PCR 检测的模板,用引物 (35S-F: CTGACGTAAGGGATGACGC; *GhSEDEG38*-R: ATCTTTCTGCAATGCGCTCAC) 进行 PCR 扩

增,产物在1%的琼脂糖凝胶上进行电泳,根据有无条带判断对应的植株是否为转基因阳性植株。

2)转基因植株拷贝数鉴定。采用天根 DNA 抽提试剂盒提取 T_0 代阳性的转基因单株及 T_2 代株系的部分单株的基因组 DNA,通过 Southern 杂交检测转基因植株的拷贝数,具体操作参照文献[24]。

3)转基因植株基因表达水平鉴定。分别取适量 YZ1 及各转基因阳性株的叶片,采用改良的异硫氰酸胍法提取 RNA^[25],电泳检测样品质量、纯度, NanoDrop 检测 RNA 浓度。将合格的 RNA 样品进行反转录生成 cDNA,稀释 50 倍后作为模板,以 *GhUbi7* 作为内参,通过 RT-PCR 检测目标基因的表达量。

1.6 转基因材料的表型观察

为了研究 *GhSEDEG38* 在棉花盐胁迫响应中的功能,对上述选取的纯系材料及对照材料进行萌发期盐处理。选取 YZ1 及 T_3 代转基因纯系种子,去壳后接种于 1/2MS 培养基^[24],设置 100、150 mmol/L 2 个 NaCl 浓度为处理组,以 1/2MS 培养基为对照,暗培养 48 h 后将胚根插入培养基,随后在 28 °C 下光照培养 1 周,观察表型,并统计相关生长指标。试验设置 3 次生物学重复,每次重复采用 30 粒种子。

苗期盐处理试验采用水培处理,将 YZ1 及 T_3 代转基因纯系种子萌发后,采用 Hoagland 培养液进行水培至 2 叶期,设置 150 mmol/L NaCl 为处理组,以不添加 NaCl 的 Hoagland 培养液为对照,处理 6、12 和 24 h 取样进行可溶性糖、MDA 和活性氧含量的测定,培养 1 周后观察植株表型。设置 3 个生物学重复,每个重复采用 30 个单株。

1.7 丙二醛、过氧化氢和可溶性糖含量的测定

1)丙二醛(MDA)含量的测定。采用 TCA 法,取约 100 mg 对照及干涉株系的叶片,剪刀剪碎后加 2 mL 10%三氯乙酸(TCA),用预冷的研钵置于冰上研磨至匀浆状,倒入 2 mL 离心管中。在 12 000 r/min 下 4 °C 离心 10 min,取上清液 0.8 mL (V_2)至新的 2 mL 的离心管中,向其中加入 0.8 mL 0.6%硫代巴比妥酸(TBA),混合后在 100 °C 沸水中煮 15 min,在冰上立即冷却后离心取上清。用分光光度计分别测定上清液在 450、532 和 600 nm 处的光密度值。并按公式 $C = [6.45 \times (D_{532} - D_{600}) - 0.56 \times D_{450}] \times (V_1 \times V) / (V_2 \times m)$ 计算 MDA 浓度,其中 V_1 为反应液总量, mL ; V_2 为反应中提取液量,

mL ; V 为提取液总量, mL ; m 为样品质量, g。

2)过氧化氢(H_2O_2)定量测定。采用试剂盒法,将对照和干涉株系的叶片用液氮研磨,取 100 mg 左右的样品至 2 mL 的离心管中,立即加入 1 mL 预冷的丙酮,振荡 20 min, 4 °C、13 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液至新的离心管用于后续实验。按照试剂盒 quantification kit(Sangon Biotech, 上海)提供的方法对样品 H_2O_2 进行测定。

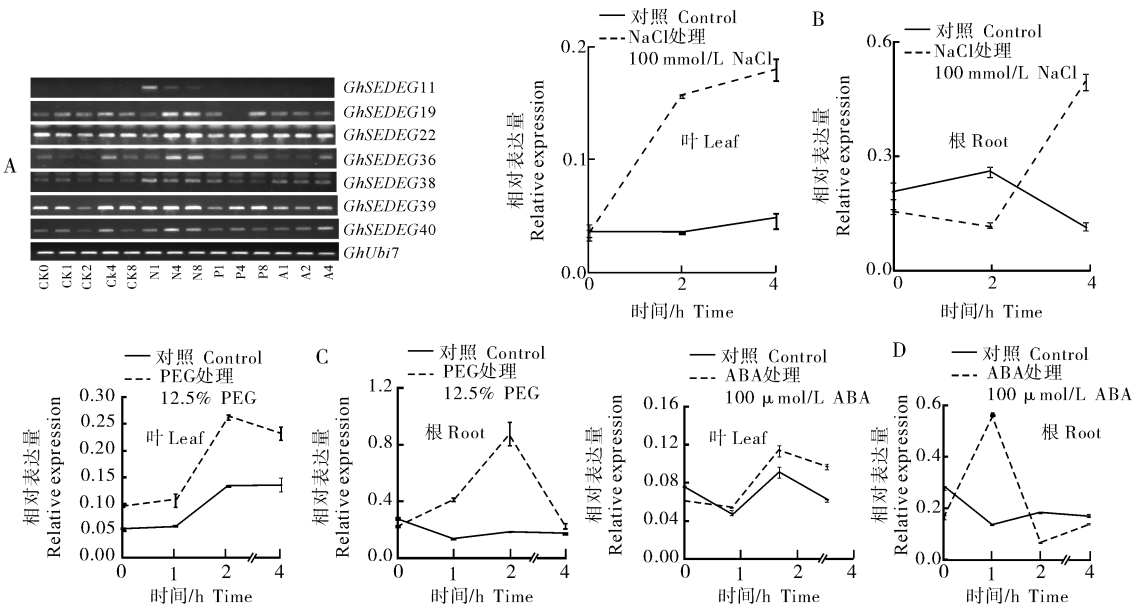
3)可溶性糖含量测定。采用硫酸-蒽酮法,取 100 mg 对照及干涉株系的叶片,加水 200 μ L,磨样珠 1 粒,60 Hz 磨样 1 min。磨完后补水至 1 mL,混匀,80 °C 水浴 30 min,取出冷却至常温,12 000 r/min 离心 10 min。离心后取上清并稀释 5 倍,取稀释后提取液(或 0~200 μ g/mL 梯度葡萄糖标准液)100 μ L 于 2 mL 离心管,缓慢加入硫酸蒽酮试剂(0.2 g 蒽酮溶于 100 mL 98%浓硫酸)200 μ L,混匀,90 °C 水浴 10 min,取出冷却至常温,瞬时离心后取反应液 200 μ L,酶标仪测定 620 nm 吸光值,根据标准曲线计算可溶性糖含量。

2 结果与分析

2.1 棉花 *GhSEDEG38* 基因的克隆及序列分析

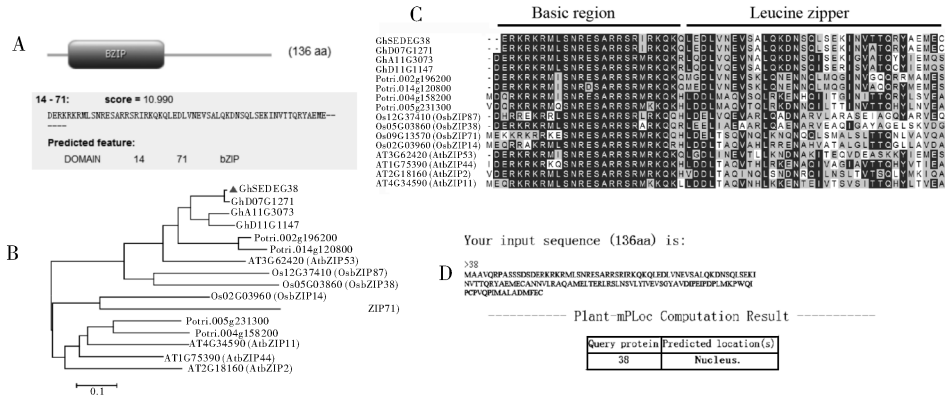
基于体胚发生的表达谱,本研究通过分析体胚发生过程中不同时间点的基因表达模式,挑取了差异表达的转录因子 40 个,通过 RT-PCR 和 qRT-PCR 进行盐处理表达模式的分析。结果表明,很多基因受一种或几种逆境诱导,其中 *GhSEDEG11*、*GhSEDEG19*、*GhSEDEG22*、*GhSEDEG36*、*GhSEDEG38*、*GhSEDEG39*、和 *GhSEDEG40* 在盐胁迫下的根中的表达水平发生变化(图 1A)。选取 *GhSEDEG38* 对其在不同逆境处理下(100 mmol/L NaCl、12.5% PEG6000、100 μ mol/L ABA)进行 qRT-PCR 分析,发现其在叶中受盐诱导显著上调表达,在根中盐胁迫处理 4 h 也上调表达,PEG 和 ABA 处理也有一定差异表达(图 1B-D)。因此,本研究选取 *GhSEDEG38* 进一步研究其对盐胁迫的响应。

GhSEDEG38 基因编码一个含有 136 个氨基酸的蛋白质,分子质量为 15.6 ku,等电点为 7.79。序列分析发现 *GhSEDEG38* 基因属于 bZIP 家族,具有 bZIP 转录因子典型的碱性亮氨酸拉链结构域,



A: 7 个转录因子在逆境处理下的 RT-PCR 分析; CK 表示对照处理, N、P、A 分别表示 100 mmol/L NaCl、12.5% PEG6000 和 100 μ mol/L ABA 处理; 0、1、2、4、8 分别表示处理的时间, h; B: 100 mmol/L NaCl 处理下 *GhSEDEG38* 的表达模式; C: 12.5% PEG6000 处理下 *GhSEDEG38* 的表达模式; D: 100 μ mol/L ABA 处理下 *GhSEDEG38* 的表达模式, *GhUbi7* (*DQ116441*) 为内参基因; 试验设置 3 个生物学重复, 每重复设置 3 个技术重复。A: RT-PCR analysis of 7 transcription factors in response to different abiotic stresses. N, P, A represent 100 mmol/L NaCl, 12.5% PEG6000 and 100 μ mol/L ABA treatments. 0, 1, 2, 4, 8 represent the hours of treatments. B: Expression patterns of *GhSEDEG38* under 100 mmol/L NaCl; C: Expression patterns of *GhSEDEG38* under 12.5% PEG6000; D: Expression patterns of *GhSEDEG38* under 100 μ mol/L ABA treatment. The *GhUbi7* (*DQ116441*) was used as the internal control to calculate and normalize the expression levels. Three independent experiments were performed as each with three technical replicates; the error bars indicating standard deviations.

图 1 7 个转录因子的 RT-PCR 分析及 *GhSEDEG38* 的逆境表达模式分析
Fig.1 RT-PCR analysis of 7 transcription factors and qRT-PCR analysis of *GhSEDEG38* in response to different abiotic stress



A: *GhSEDEG38* 结构分析; B: 几个物种中 *GhSEDEG38* 同源蛋白的进化树分析; C: *GhSEDEG38* 与其他 bZIP 转录因子的保守区序列比对; D: *GhSEDEG38* 蛋白的定位预测结果。A: bZIP domain of *GhSEDEG38*; B: Phylogenetic analysis of homologous protein *GhSEDEG38* in different plants; C: Phylogenetic analysis of conserved domains in bZIP transcription factors; D: Localization prediction of *GhSEDEG38*.

图 2 *GhSEDEG38* 序列及进化树分析

Fig.2 Phylogenetic trees and sequences analysis of *GhSEDEG38*

由 14~71 位氨基酸组成(图 2A);*GhSEDEG38* 与不同物种中同源基因的氨基酸比对结果表明,*GhSEDEG38*蛋白与杨树中 Potri.002g196200 同源性最高,与拟南芥中 AT3G62420(*AtbZIP53*)同源(图 2B);而且 *bZIP* 的碱性区域和亮氨酸拉链结构域在不同物种间具有很高的保守性(图 2C);Plant-mPLoc 网站预测 *GhSEDEG38* 定位于细胞核

(图 2D)。
利用 PlantCARE 在线预测*GhSEDEG38*上游 1.5 kb 启动子区域的顺式作用元件,发现此区域内存在大量的植物激素如茉莉酸、乙烯和水杨酸响应元件,也存在很多如光、热、防御和逆境响应元件(表 1),由此推测 *GhSEDEG38* 可能参与植物逆境胁迫响应。

表 1 *GhSEDEG38* 基因启动子区顺式作用元件的预测
Table 1 *cis*-Element analysis of *GhSEDEG38* gene in *G. hirsutum*

名称 Name	序列 Sequence	位置 Position	功能 Function
ARE	TGGTTT	1 176	厌氧响应 For the anaerobic induction
CGTCA-motif	CGTCA	967	茉莉酸响应元件 Involved in the MeJA-responsiveness
ERE	ATTTCAAA	516,756	乙烯响应元件 Ethylene-responsive element
G-box	CACGTT	786	光响应元件 Involved in light responsiveness
HSE	AAAAAATTTTC	511,656,713	热响应元件 Involved in heat stress responsiveness
MRE	AACCTAA	913	MYB 结合位点 MYB binding site
TC-rich repeats	ATTTTCTCCA	508	防御和逆境响应 Involved in defense and stress responsiveness
TCA-element	GAGAAGAATA	28,413,104,861,336	水杨酸响应元件 Involved in salicylic acid responsiveness
Circadian	CAANNNNATC	117,416	节律相关元件 Involved in circadian control

2.2 *GhSEDEG38*-RNAi 载体的构建、转基因及转基因材料鉴定

为了研究 *GhSEDEG38* 在陆地棉中的功能,选取 200 bp 基因编码区构建 *GhSEDEG38* 干扰表达载体(*GhSEDEG38*-RNAi)并转化棉花(图 3A),获得 T₀代转基因植株,以转基因植株叶片 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。结果表明转基因阳性率较高(图 3B)。转基因阳性单株进行种植连续自交至 T₂代,检测单株的拷贝数,发现 38-2 和 38-3 为单拷贝株系,而 38-5 和 38-9 为多拷贝株系(图 3C),定量 PCR 检测转基因材料的表达量,发现 4 个干涉株系的表达量显著降低(图 3D),选取其中 2 个单拷贝(38-2 和 38-3)和 1 个多拷贝株系(38-5)进行后续分析。

2.3 *GhSEDEG38*-RNAi 转基因材料萌发期对盐胁迫的响应

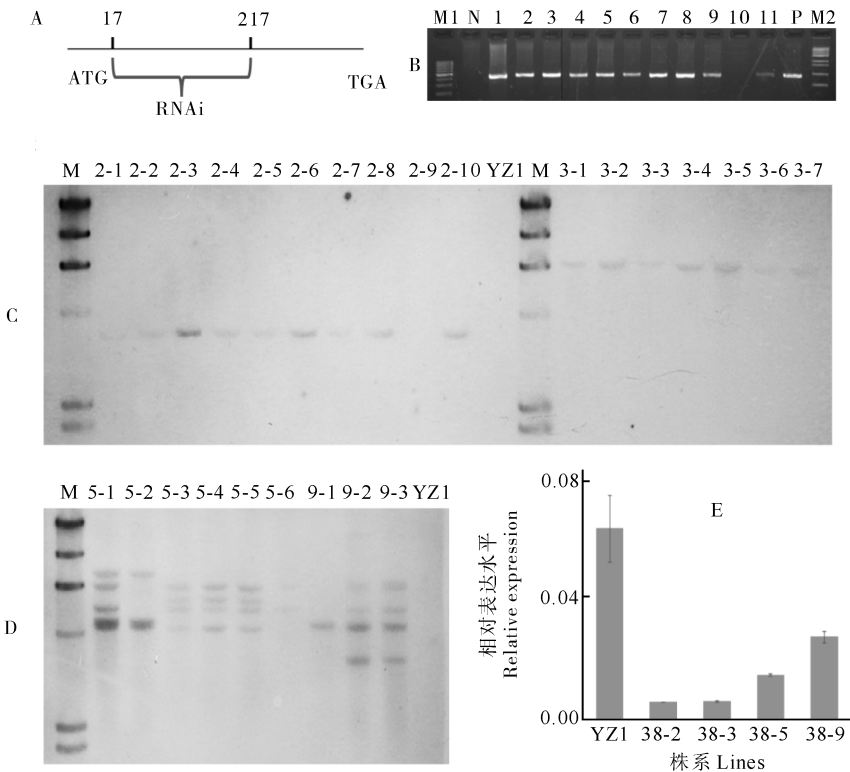
在不添加 NaCl 的培养基中,转基因材料在萌发期的生长发育比对照材料稍弱,说明干涉

*GhSEDEG38*基因对生长发育有一定影响;在 NaCl 处理的条件下,所有材料的生长都受到抑制,表现为主根缩短、下胚轴不同程度缩短、鲜质量减轻、侧根受到一定程度抑制(图 4A-B)。在正常情况下和处理情况下,干涉材料的下胚轴长度均显著低于对照材料,而盐胁迫下干涉材料下胚轴伸长抑制更明显。100 mmol/L 盐处理使对照下胚轴伸长比正常情况下缩短 2.91%,而 3 个转基因株系分别缩短 23.1%、27.5% 和 26.9%,150 mmol/L 盐处理使对照下胚轴伸长比正常情况下缩短 30.4%,而 3 个转基因株系分别缩短 40.3%、39.6% 和 41.9%。同时,正常情况下,干涉株系 38-3 的鲜质量比对照显著降低,其他干涉株系的鲜质量与对照无显著差异;100 mmol/L 和 150 mmol/L 盐处理使干涉株系的鲜质量显著降低(图 4C)。说明 *GhSEDEG38* 干涉株系对盐胁迫更加敏感。

一般情况下,植物组织可溶性糖浓度越高,耐盐性越强。本研究结果表明,所有材料在盐处理后,可

溶性糖都有一定程度上升,而在盐处理 24 h 后, *GhSEDGE38*转基因材料可溶性糖含量均显著低于对照材料(图 5F)。盐处理 12 h MDA 测定结果显示,与正常处理对照相比, *GhSEDGE38* 转基因株系和对照的 MDA 含量在盐处理条件下均升高,但是,转基因株系中 MDA 含量的升高程度显著高于对照(图 5G),表明干涉 *GhSEDGE38* 加重了盐处理造成的氧化伤害。H₂O₂ 含量测定结果表明,在正常生

长的环境下,野生型植株和转基因株系体内 H₂O₂ 含量无显著差异。盐处理后,野生型植株和转基因株系体内 H₂O₂ 含量均升高,但是,与野生型植株相比,有 2 个转基因株系中 H₂O₂ 含量的升高幅度高于野生型(图 5H)。这些结果表明,干涉 *GhSEDGE8* 棉花对盐胁迫更加敏感,可能与干涉植株增加活性氧的积累、进而加重盐胁迫造成的膜脂过氧化程度有关。



A: *GhSEDGE38* 的干涉区段; B: *GhSEDGE38*-RNAi 转基因材料的 PCR 阳性鉴定, N 为 YZ1 阴性对照, P 表示阳性质粒对照, 1~11 表示转基因 T₀ 植株, M1 和 M2 表示 DNA Marker; C-D: 转基因材料 Southern 杂交, 2-1 到 2-10 表示来自于 38-2 株系的 T₂ 的 10 个单株, 3-1 到 3-7 表示来自于 38-3 株系的 T₂ 的 7 个单株, 5-1 到 5-6 表示来自于 38-5 株系的 T₂ 的 6 个单株, 9-1 到 9-3 表示来自于 38-9 株系的 T₂ 的 3 个单株, YZ1 为阴性对照株系, M 表示 Marker; E: *GhSEDGE38*-RNAi 干涉株系的表达量检测, YZ1 为阴性对照。A: The sequence region for RNAi vector; B: PCR analysis of *GhSEDGE38*-RNAi transgenic plants. N represents the negative control, P represents the positive plasmid control, 1-11 represents T₀ transgenic plants; M1 and M2 represents DNA marker. C-D: Southern blot analysis of *GhSEDGE38*-RNAi transgenic plants. 2-1 to 2-10 represents ten T₂ plants from transgenic line 38-2; 3-1 to 3-7 represents seven T₂ plants from transgenic line 38-3; 5-1 to 5-6 represents six T₂ plants from transgenic line 38-5; 9-1 to 9-3 represents three T₂ plants from transgenic line 38-9; YZ1 represents the negative control plant, M represents DNA marker. E: Expression analysis of different *GhSEDGE38*-RNAi transgenic lines. YZ1 represents the negative control plant.

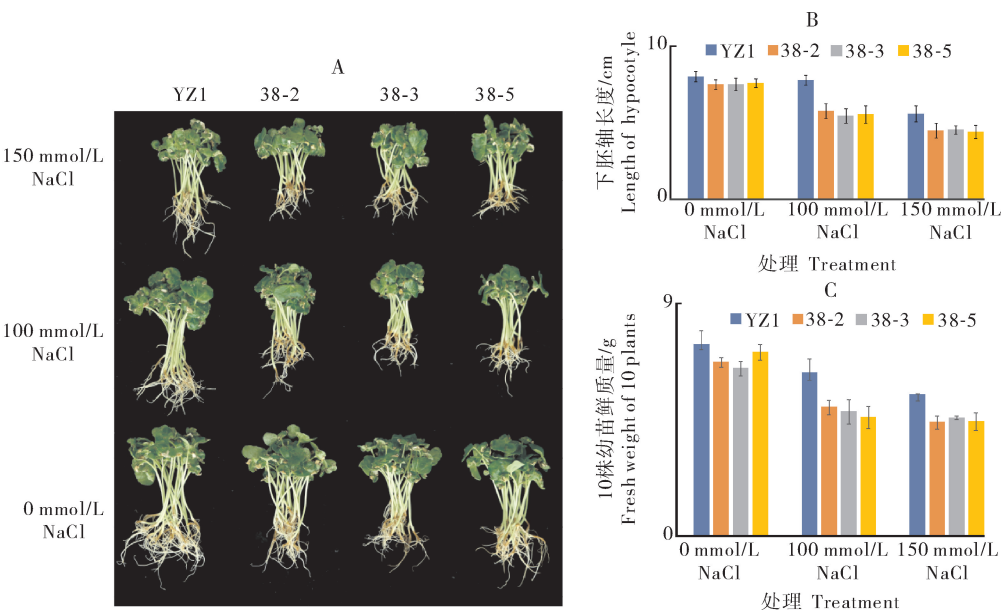
图 3 *GhSEDGE38*-RNAi 干涉载体的构建及转基因材料分子鉴定

Fig.3 Construction of *GhSEDGE38*-RNAi vector and the analysis of transgenic plants

2.4 *GhSEDGE38*-RNAi 干涉转基因材料苗期对盐胁迫的响应

苗期盐处理结果表明,在不添加 NaCl 的 Ho-

agland 营养液中,转基因材料的生长发育与对照材料没有显著性差异,而在添加 NaCl 的营养液中,所有材料的生长都受到抑制,表现为株高变短、主根缩



A: 3 个转基因系和对照 YZ1 在不同盐浓度下萌发 7 d 后的表型; B: 下胚轴长度统计结果; C: 10 株幼苗鲜质量统计结果。实验均设置 3 个生物学重复, 每个重复采用 30 个单株。A: Phenotype of *GhSEDGE38*-RNAi transgenic lines under salt treatments at germination stage, 38-2, 38-3 and 38-5 represent 3 transgenic lines, YZ1 represents the negative control plants. B: The length of hypocotyle of transgenic lines and YZ1 after 9 days. C: The fresh weight of 10 plants from transgenic lines and YZ1 after 9 days. Three independent experiments were performed as each with three technical replicates; the error bars indicating standard deviations. Statistical significance in (B) and (C) was determined by multiple comparison with null as control, * : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$.

图 4 干扰 *GhSEDEG38* 基因降低棉花萌发期对盐的耐受性

Fig.4 Defective of *GhSEDEG38* decreased the tolerance of transgenic lines under salt treatments at germination stage

短、鲜质量减轻等,且在处理的情况下, *GhSEDEG38*转基因株系与对照材料株高显著低于对照组主、根长显著短于对照组,鲜质量显著小于对照组(图 5A-E)。综合苗期处理的表型指标表明, *GhSEDEG38* 干扰株系对盐胁迫更加敏感。

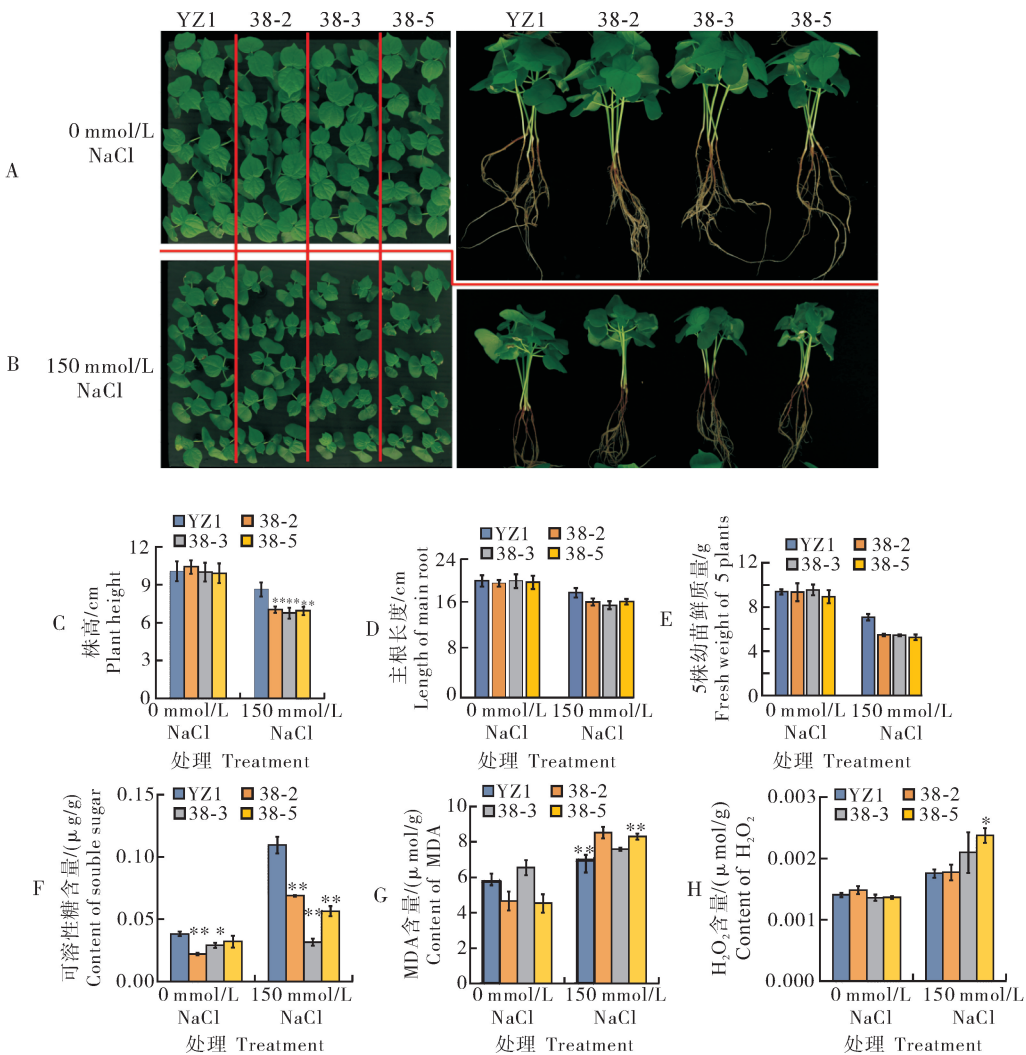
3 讨 论

棉花作为盐碱地的先锋作物,其耐盐性较粮食作物稍强。然而受农业结构调整、生态退耕、自然灾害损毁等影响,我国耕地资源逐年减少,我国棉花逐渐向西北内陆盐碱较重且水资源相对短缺的地方发展,棉花虽然能够在这些地方种植并存活,但其产量和纤维品质仍受较大的影响。传统育种方法由于周期长、盲目性大、存在远缘杂交不亲和和品质退化等缺陷,已经无法满足农业生产的需求。分子育种技术的发展为作物遗传改良提供了新的思路和途径。农杆菌介导的外源基因转化技术为科研工作者提供了更为准确和快捷的育种手段。本研究通过 RNAi

技术和转基因技术,实现对目的基因的定向沉默,并分析转基因材料的性状,揭示该基因功能。

前期的研究中,笔者所在课题组通过对体胚胎发育过程筛选得到多个转录因子基因,这些转录因子分属 ERF、bZIP、WRKY、MYB 等基因家族^[22],同时在合子胚和体胚的比较表达谱中,发现体胚发生过程伴随着强烈的逆境响应,因此,我们认为体胚发生体系可作为发掘棉花抗逆基因的方法、体系^[17]。本研究选取 40 个转录因子基因对其在逆境处理下的表达模式进行分析,对这些基因功能的解析可以为棉花抗逆育种提供新材料和理论依据。

GhSEDEG38 的序列分析表明, *GhSEDEG38* 基因编码 bZIP 类转录因子。该基因定位于陆地棉 A 亚组,通过与拟南芥数据库比对,发现其蛋白序列与拟南芥转录因子 AtbZIP53(AT3G62420)高度同源(图 2),有报道指出 AtbZIP53 在拟南芥中与盐胁迫应答和氨基酸代谢密切相关^[26],故推测 *GhSEDEG38*同样参与棉花对盐胁迫的应答。通过



A: 3 个转基因株系和对照材料在不添加 NaCl 的 Hoagland 营养液里生长 7 d 后的表型;B:3 个转基因株系和对照材料在添加 NaCl 的 Hoagland 营养液里生长 7 d 后的表型; C:处理 7 d 后株高; D:处理 7 d 后主根长; E:处理 7 d 后 5 株幼苗鲜质量; F:处理 24 h 后可溶性糖含量; G:处理 12 h 后 MDA 含量; H:处理 12 h 后 H₂O₂ 含量。试验均设置 3 个生物学重复,每个重复采用 30 个单株。A: Phenotype of *GhSEDGE38*-RNAi transgenic lines under normal condition; B: Phenotype of *GhSEDGE38*-RNAi transgenic lines under 150 mol/L NaCl treatment at seedling stage; the plant height (C),length of main root (D) and fresh weight (E) of transgenic lines and YZ1 after 7 days treatment,The amount of soluble sugar (F) after 24 hours treatment,The contentt of MDA (G) and H₂O₂(H) after 12 hours treatment.38-2,38-3 and 38-5 represent 3 transgenic lines; YZ1 represents the negative control plants. Three independent experiments were performed as each with three technical replicates; The error bars indicating standard deviations,Statistical significance in (C-H) was determined by multiple comparison with null as control, * : $P<0.05$, * * : $P<0.01$.

图 5 干扰 *GhSEDGE38* 基因降低棉花三叶期对盐胁迫的耐受性

Fig.5 RNAiof *GhSEDGE38* decreased the tolerance of transgenic lines under salt treatments at 3-leaf stage

对萌发期和苗期的盐处理表明,干扰 *GhSEDEG38* 基因的表达使棉花对盐胁迫更为敏感(图 4、图 5),表现为生长受到抑制,逆境相关指标发生变化。此外,发现 *GhSEDEG38* 同样受 PEG 诱导上调表达,而渗透胁迫本身是盐胁迫影响植物发育和代谢的方

式之一,推测 *GhSEDEG38* 可能同时参与棉花对干旱胁迫的应答。

bZIP 类转录因子广泛存在于所有的高等植物,部分成员作为 ABA 信号通路中的重要元件,参与植物对高温、干旱、盐、光照等逆境胁迫的影响^[27-29]。

本研究观察到,对 YZ1 根部施加外源 ABA 胁迫,在最初的 1 h 中 *GhSEDEG38* 的水平大幅度上调,*GhSEDEG38* 可能同样作为 ABA 信号通路中的元件参与棉花响应非生物逆境胁迫的过程。

参 考 文 献

- [1] 李建国,濮励杰,朱明,等.土壤盐渍化研究现状及未来研究热点[J].地理学报,2012,67(9): 1233-1245.
- [2] 胡时开,陶红剑,钱前,等.水稻耐盐性的遗传和分子育种的研究进展[J].分子植物育种,2010,8(4): 629-640.
- [3] 张景云,缪南生,赵萍,等.马铃薯耐盐性的研究进展[J].植物生理学报,2011,47(11): 1047-1052.
- [4] 戴海芳,武辉,阿曼古丽·买买提阿力,等.不同基因型棉花苗期耐盐性分析及其鉴定指标筛选[J].中国农业科学,2014,47(7): 1290-1300.
- [5] 吕秀云,油天钰,赵娟,等.盐胁迫下藜的形态结构与生理响应[J].植物生理学报,2012,48(5): 477-484.
- [6] 朱亚莎,陈太钰,吴杰敏,等.不同胁迫处理对促进 *Eleocharis baldwinii* 形成 C4 结构的效应[J].华中农业大学学报,2017,36(1): 10-15.
- [7] LIANG C Z, MENG Z H, MENG Z G, et al. *GhABF2*, a bZIP transcription factor, confers drought and salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Scientific report, 2016, 6: 35040. doi:10.1038/srep35040.
- [8] 韩张雄,李利,徐新文,等. NaCl 对 4 种荒漠豆科植物幼苗生理参数的影响[J].植物学报,2012,47(5): 491-499.
- [9] 杨晓慧,蒋卫杰,魏珉,等.植物对盐胁迫的反应及其抗盐机理研究进展[J].山东农业大学学报(自然科学版),2006,37(2): 302-305.
- [10] 叶武威.棉花种质的耐盐性及其耐盐基因表达的研究[D].北京:中国农业科学院,2007.
- [11] 蒋玉蓉,吕有军,祝水金.棉花耐盐机理与盐害控制研究进展[J].棉花学报,2006,18(4): 248-254.
- [12] 王伟,咸丽霞,张媛.蕾期盐胁迫对棉花生长发育的影响[J].现代农业科技,2014(4): 21,23.
- [13] KIKUCHI A, SANUKI N, HIGASHI K, et al. Absciscic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells [J]. Planta, 2005, 223(4): 637-645.
- [14] PASTERNAK T P, PRINSEN E, AYAYDIN F, et al. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa [J]. Plant physiology, 2002, 129(4): 1807-1819.
- [15] 胡忠,徐艳,高欢欢,等.影响宁夏枸杞愈伤组织体细胞胚发生的因素[J].汕头大学学报(自然科学版),2006,21(4): 57-63.
- [16] 由香玲,谭啸,戴金玲,等.胁迫诱导植物体细胞胚发生的研究进展[J].西北植物学报,2010,30(9): 1929-1934.
- [17] JIN F, HU L, YUAN D, et al. Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in cotton: evidence for stress response functions in SE development [J]. Plant biotechnology journal, 2014, 12(2): 161-173.
- [18] ZHOU T, YANG X, GUO K, et al. ROS homeostasis regulates somatic embryogenesis via the regulation of auxin signaling in cotton [J]. Molecular & cellular proteomics, 2016, 15(6): 2108-2124.
- [19] JAKOBY M, WEISSHAAR B, DROGE-LASER W, et al. bZIP transcription factors in Arabidopsis [J]. Trends in plant science, 2002, 7(3): 106-111.
- [20] SINGH K B, FOLEY R C, ONATE-SANCHEZ L. Transcription factors in plant defense and stress responses [J]. Current opinion in plant biology, 2002, 5(5): 430-436.
- [21] FINKELSTEIN R R, LYNCH T J. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor [J]. The plant cell, 2000, 12: 599-609.
- [22] YANG X, ZHANG X, YUAN D, et al. Transcript profiling reveals complex auxin signalling pathway and transcription regulation involved in dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton [J]. BMC plant biology, 2012, 12: 110.
- [23] HELLIWELL C A, WESLEY S V, WIELOPOLSKA A J, et al. High-throughput vectors for efficient gene silencing in plants [J]. Functional plant biology, 2002, 29(10): 1217-1225.
- [24] JIN S, ZHANG X, LIANG S, et al. Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Plant cell tissue and organ culture, 2005, 81(2): 229-237.
- [25] ZHU L, TU L, ZENG F, et al. An improved simple protocol for isolation of high quality RNA from *Gossypium* spp. suitable for cDNA library construction [J]. Acta agronomica sinica, 2005, 31: 1657-1659.
- [26] HARTMANN L, PEDROTTI L, WEISTE C, et al. Crosstalk between two bZIP signaling pathways orchestrates salt-induced metabolic reprogramming in *Arabidopsis* roots [J]. Plant cell, 2015, 27(8): 2244-2260.
- [27] SKUBACZ A, DASZKOWSKA-GOLEC A, SZAREJKO I. The role and regulation of *ABI5* (ABA-Insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 1884-1990.
- [28] UNO Y, FURIHATA T, ABE H, et al. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(21): 11632-11637.
- [29] KANG J Y. *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling [J]. The plant cell, 2002, 14(2): 343-357.

Functional analyses of cotton salt tolerance regulated by *GhSEDEG38* gene in cotton

ZHANG Boyang JIAN Yinan LI Meng YANG Xiyan ZHANG Xianlong

*National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/College of Plant Science and Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract A series of differentially expressed transcription factors were selected from the expression profiles of somatic embryos at different stages of cotton regeneration. The expression of *GhSEDEG38* (somatic embryogenesis differentially expression gene 38) was significantly up-regulated by salt stress by analyzing the expression of these transcription factors under different stress treatments with RT-PCR and qRT-PCR. Sequence analyses revealed that *GhSEDEG38* encodes a bZIP-type transcription factor that is homologous to the *Arabidopsis* bZIP53 gene. In order to further verify the function of the gene, RNAi interference vectors of this gene were constructed and transformed into cotton, and transgenic cotton lines with significantly reduced expression levels were obtained through molecular detection. We compared the growth index and physical parameters between RNAi and control lines under salt treatments. The results showed that the down regulated expression of *GhSEDEG38* reduced the resistance of cotton to salt stress during seed germination and early seedling stage. The MDA content and reactive oxygen species in transgenic plants was significantly higher than those in the control line, while the soluble sugar content was significantly lower than that in the control line. It is indicated that *GhSEDEG38* might be involved in the response to salt stress in cotton.

Keywords cotton; bZIP(basic-region leucine domain zipper); *GhSEDEG38* (somatic embryogenesis differentially expression gene 38); RNAi; salt stress response

(责任编辑:张志钰)